

Azotobacter sebagai Bioakumulator Merkuri

Kusnul Khotimah dan Enny Zulaika

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,

Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS)

Jl. Arief Rahman Hakim, Surabaya 60111 Indonesia

e-mail: enny@bio.its.ac.id

Abstrak— Merkuri merupakan logam berat paling toksik dibandingkan dengan logam berat lainnya. Beberapa bakteri ada yang resisten merkuri. Salah satu genus bakteri resisten merkuri dan mampu mengakumulasi merkuri yaitu *Azotobacter*. *Azotobacter* merupakan bakteri pemfiksasi nitrogen bebas non simbiotik yang melimpah di daerah rhizosfer lahan pertanian dan merupakan bakteri penghasil EPS yang dapat berfungsi sebagai pengkhat logam. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat *Azotobacter* yang resisten terhadap merkuri HgCl_2 , dan mengukur kemampuan bioakumulasinya terhadap HgCl_2 . Isolasi bakteri *Azotobacter* dilakukan dengan media selektif *Azotobacter*. uji resistensi HgCl_2 dilakukan dengan streak agar miring dan kemampuan bioakumulasi diukur dengan metode serapan atom serta uji viabilitas menggunakan metode pour plate. Analisis beda nyata dengan ANOVA pada taraf 5% dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (BNT). Tiga isolat *Azotobacter* dari lahan eco urban farming ITS resisten terhadap HgCl_2 sampai 20 mg/L yaitu A5, A6, dan A9. Efisiensi bioakumulasi yang tertinggi pada paparan HgCl_2 5 mg/L yaitu isolat A5 (89%) dan A9 (87%).

Kata Kunci—*Azotobacter*, Bioakumulator, Merkuri, Uji resistensi.

I. PENDAHULUAN

MERKURI merupakan salah satu logam berat paling toksik dan keberadaannya di lingkungan dapat terakumulasi pada berbagai tingkat trofik rantai makanan. Pencemaran merkuri di lingkungan telah menjadi masalah dunia karena tingkat kontaminasinya di lingkungan semakin lama semakin meningkat akibat aktivitas antropogenik dan kegiatan industri yang menggunakan merkuri [1]. Toksisitas merkuri tergantung dari struktur kimianya, rute masuknya dalam tubuh dan lamanya paparan [2]. Merkuri dalam bentuk ion (Hg^{2+}) akan terakumulasi di ginjal dan metil merkuri (CH_3Hg) akan terakumulasi di otak [3]. Kasus keracunan merkuri pertama kali dilaporkan di Minamata Jepang pada tahun 1956 yang kemudian dinamakan “Minamata Disease” dengan gejala kerusakan otak, gangguan bicara, dan hilangnya keseimbangan [4].

Toksisitas logam berat merkuri dapat dikurangi oleh aktivitas bakteri. Beberapa bakteri mampu hidup pada lingkungan yang tercemar merkuri disebut bakteri resisten merkuri (BRM). Bakteri resisten merkuri biasanya memiliki gen resisten merkuri yang disebut gen *mer operon* [5]. Umumnya struktur *mer operon* terdiri dari gen metaloregulator (*merR*), gen transport merkuri (*merT*, *merP*, *merC*, *merF*), gen merkuri reduktase (*merA*) dan organomercuri liase (*merB*) [6].

Gen *merA* mengkode merkuri reduktase yang berfungsi untuk mereduksi Hg^{2+} menjadi Hg^0 volatil dan *merB* mengkode organomercuri liase yang berfungsi untuk memutus ikatan C-Hg. Bakteri resisten merkuri dibagi menjadi 2 tipe yaitu (1) bakteri resisten merkuri spektrum sempit adalah bakteri yang hanya resisten terhadap merkuri anorganik dan (2) bakteri resisten merkuri spektrum luas adalah bakteri yang resisten terhadap merkuri anorganik dan merkuri organik [7]. Berdasarkan penelitian Zulaika, dkk., Genus *Bacillus*, *Staphylococcus*, dan *Azotobacter* merupakan bakteri resisten merkuri pada 11 mg/L HgCl_2 [8]. *Azotobacter* adalah bakteri non simbiotik yang mampu memfiksasi nitrogen, melarutkan fosfat [9], dan banyak ditemukan di rhizosfer lahan pertanian [10]. Disamping itu bakteri *Azotobacter* juga merupakan bakteri resisten merkuri dan dapat berperan sebagai bioakumulator merkuri [11]. Berdasarkan penelitian [12], *Azotobacter* yang telah diisolasi dari tanah pertanian, mampu resisten sampai dengan konsentrasi 100 nmol HgCl_2 dan mampu mereduksi 2,6 mg HgCl_2 dalam 200 ml media *Nutrient Broth* (NB) yang mengandung HgCl_2 3,3 mg.

Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS), mempunyai lahan *eco urban farming* yang ditanami sayuran organik dan pupuk yang digunakan adalah pupuk organik atau kompos [13]. Salah satu bakteri yang berperan dalam meningkatkan hara nitrogen dalam kompos adalah *Azotobacter* [14]. Isolasi bakteri *Azotobacter* di lahan *eco urban farming* ITS, selain didapatkan bakteri *Azotobacter* sebagai biofertilizer juga dapat digunakan sebagai agen bioremediasi lingkungan tercemar merkuri. Oleh karena itu perlu dilakukan isolasi bakteri *Azotobacter* untuk mengetahui tingkat resistensi dan mengukur kemampuan bioakumulasinya terhadap merkuri HgCl_2 .

II. METODOLOGI

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Januari hingga bulan Juni 2014 di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi FMIPA-ITS. Analisis bioakumulasi logam merkuri dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Konsultasi Industri Surabaya.

B. Isolasi *Azotobacter*

Isolasi *Azotobacter* dilakukan dengan cara sampel tanah dari lahan *eco urban farming* ITS diambil secara komposit, ditimbang sebanyak 10 gram, dimasukkan ke dalam 90 ml akuades steril. Dilakukan pengenceran 10^{-1} sampai dengan 10^{-7}

[15]. Masing-masing pengenceran, diambil sebanyak 0,1 ml, ditumbuhkan pada media selektif *Azotobacter* agar yang mengandung 0,1 mg/L HgCl_2 dengan metode *spread plate*. [16]. Inkubasi dilakukan pada suhu ruang selama 24 jam. Koloni yang tumbuh diamati karakteristiknya dan dibandingkan dengan kontrol positif yaitu *Azotobacter chroococcum*. Koloni *Azotobacter chroococcum* mempunyai ciri putih basah dan berubah menjadi coklat setelah 3-5 hari inkubasi [15]. Koloni yang diduga *Azotobacter chroococcum* dimurnikan dengan metode 16 goresan pada media *Nutrient Agar*. Selanjutnya dilakukan pengamatan kemurnian sel dengan metode pewarnaan methylen blue dan untuk memastikan bahwa isolat tersebut *Azotobacter*, dilakukan pewarnaan Gram dan pewarnaan kista.

C. Uji Resistensi Terhadap HgCl_2

Uji resistensi dilakukan dengan menumbuhkan isolat *Azotobacter* yang didapat dari hasil isolasi pada media selektif *Azotobacter* slant agar [11], yang mengandung HgCl_2 berbagai konsentrasi mulai dari konsentrasi 0,5 mg/L dan seterusnya sampai konsentrasi yang mampu ditoleransi isolat *Azotobacter*. Inkubasi dilakukan selama 24 jam pada suhu ruang, koloni yang tumbuh merupakan isolat yang resisten terhadap HgCl_2 . Isolat yang digunakan adalah isolat yang paling resisten terhadap HgCl_2 .

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Isolasi *Azotobacter*

Hasil isolasi *Azotobacter* menghasilkan 10 isolat dengan kode A1a, A1b, A2, A3, A5, A6, A7, A8, A9, dan A10. Isolat yang telah dipurifikasi kemudian dilanjutkan dengan pengamatan karakteristik morfologi koloni, pewarnaan Gram dan pewarnaan cista.

Tabel 1.
Karakteristik morfologi koloni isolat *Azotobacter*

Isolat	Pengamatan					
	Bentuk koloni	Elevasi	Tepi	Warna koloni muda	Warna koloni tua (> 1 bin)	Ukuran koloni
A1a	Irregular	Flat	Undulate	Krem Slimy (berair)	Coklat	1 cm
A1b	Circular	Convex	Entire	Krem bening Slimy (berair)	Krem kecoklatan	2 mm
A2	Circular	Convex	Entire	Krem kecoklatan	Coklat muda	2 mm
A3	Circular	Pulvinate	Entire	Krem bening Slimy (berair)	Kuning; pusat koloni: orange	3 mm
A5	Circular	Convex	Undulate	Putih susu	Kuning kecoklatan	3 mm
A6	Circular	Convex	Erose	Putih susu	Krem kecoklatan	3 mm
A7	Circular	Convex	Erose	Putih susu	Krem	2 mm
A8	Circular	Flat	Entire	Transparan	Transparan	2 mm
A9	Irregular	Flat	Undulate	Putih susu	Krem kekuningan	3 mm
A10	Irregular	Raised	Erose	Putih susu	Krem	5 mm

Pewarnaan cista dilakukan untuk memastikan bahwa isolat yang didapatkan adalah *Azotobacter*. Pembentukan cista diinduksi dengan cara menumbuhkan isolat *Azotobacter* pada media Burk's dengan butanol sebagai sumber karbon selama 7 hari [17]. Keberadaan cista merupakan karakter kunci pada genus *Azotobacter*. Menurut Madigan, dkk., *Azotobacter* dapat membentuk struktur istirahat (*resting cell*) yang disebut cista dimana sel dikelilingi oleh dinding sel yang tebal [18]. Hasil

pewarnaan Gram menunjukkan bahwa semua isolat adalah bakteri Gram (-), dan hasil pewarnaan cista terlihat ukuran sel menjadi lebih kecil atau lebih pendek dengan dinding cista yang tebal.



Gambar. 1. Cysta *Azotobacter* A9

B. Uji Resistensi Terhadap HgCl_2

Uji resistensi dilakukan untuk mengetahui tingkat resistensi isolat *Azotobacter* dan untuk mengetahui *range finding test* perlakuan selanjutnya yaitu uji bioakumulasi Hg^{2+} . Hasil pengukuran sampel tanah lahan *eco urban farming* ITS, konsentrasi kandungan Hg adalah 0,004 mg/L dan sampel air di sekitar lahan *eco urban farming* ITS adalah 0,002 mg/L. Isolat *Azotobacter* yang diisolasi menunjukkan sifat resistensi yang lebih tinggi dari konsentrasi merkuri dihabitatnya. Menurut Manampiring dan Keppel, suatu bakteri dikatakan resisten merkuri apabila bakteri tersebut dapat bertahan pada konsentrasi merkuri 0,01 ppm [19]. Hasil uji resistensi menunjukkan resistensi isolat *Azotobacter* terhadap HgCl_2 bervariasi seperti pada Tabel 2.

Tabel 2.
Resistensi *Azotobacter* terhadap HgCl_2 .

Isolat	Pertumbuhan isolat <i>Azotobacter</i> pada media yang mengandung HgCl_2 (mg/L)				
	0,5	5	10	15	20
A1a	+++	+++	++	-	-
A1b	+++	+++	-	-	-
A2	+++	+++	-	-	-
A3	+++	+++	-	-	-
A5	+++	+++	+++	+++	++
A6	+++	+++	+++	+++	++
A7	+++	+++	+++	+++	-
A8	+++	+++	-	-	-
A9	+++	+++	+++	+	+
A10	+++	+++	+++	++	-

Ket : +++ (baik), ++ (cukup baik), + (kurang baik).

Berdasarkan pada tabel 2, semua isolat *Azotobacter* mampu tumbuh dengan baik pada konsentrasi 0,5 dan 5 mg/L HgCl_2 kecuali isolat A1a yang mampu tumbuh cukup baik pada konsentrasi 5 mg/L HgCl_2 . Pada konsentrasi 10 mg/L HgCl_2 , hanya isolat A5, A6, A7, A9, dan A10 yang mampu tumbuh dengan baik. Pada konsentrasi 15 mg/L HgCl_2 terdapat 3 isolat (A5, A6, A7) mampu tumbuh baik, dan pada konsentrasi 20 mg/L HgCl_2 hanya 2 isolat yang mampu tumbuh cukup baik yaitu A5, dan A6.

Isolat *Azotobacter* yang berhasil diisolasi menunjukkan tingkat resistensi terhadap merkuri yang berbeda-beda. Perbedaan tingkat resistensi terhadap merkuri HgCl_2 disebabkan oleh susunan gen *mer* operon yang berbeda disetiap isolat. Komponen gen *mer* operon pada setiap spesies adalah tidak sama, terdapat variasi komposisi gen-gen

penyusunnya [20]. Selain itu, perbedaan kemampuan resistensi juga dipengaruhi oleh perbedaan tingkat ekspresi gen *mer operon* antara spesies bakteri satu dengan spesies bakteri yang lain [21].

Isolat yang digunakan pada uji bioakumulasi adalah isolat yang paling resisten dengan morfologi koloni yang mempunyai perbedaan menyolok, isolat tersebut adalah A1a, A5, dan A9. Pemilihan ketiga isolat tersebut didasarkan pada perbedaan karakteristik morfologi koloni tua dan tingkat resistensinya terhadap HgCl₂ diatas 10 mg/L. Isolat A1a mempunyai warna koloni coklat, resisten pada 10 mg/L HgCl₂, A5 kuning kecoklatan dan A9 krem kekuningan yang resisten terhadap HgCl₂ 20 mg/L. Data uji bioakumulasi tidak ditampilkan.

IV. KESIMPULAN/RINGKASAN

Sepuluh isolat *Azotobacter* resisten merkuri yang diisolasi dari lahan *eco urban farming* ITS yaitu A1a, A1b, A2, A3, A5, A6, A7, A8, A9, dan A10. Semua isolat resisten 0,5 dan 5 mg/L HgCl₂, dan hanya 3 isolat yang resisten sampai dengan konsentrasi 20 mg/L yaitu isolat A5, A6, dan A9.

UCAPAN TERIMA KASIH

“K.K mengucapkan terima kasih kepada ibu N. Dwianita Kuswyasari, S.Si., M.Si, dan ibu Wirdhatul Muslihatin, S.Si., M.Si, selaku dosen penguji, atas kritik, saran dan masukannya demi kesempurnaan tugas akhir ini. Penulis juga mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang tinggi kepada ayahanda dan ibunda, adik-adik serta keluarga atas doa dan kasih sayangnya. Penelitian ini juga tidak lepas dari bantuan dan dukungan teman-teman seperjuangan angkatan 2010, dan seluruh pihak yang tidak dapat saya sebut satu persatu.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] P. Keramati, M. Hoodaji, and A. Tahmourespour, “Multi-Metal Resistance Study of Bacteria Highly Resistant to Mercury Isolated from Dental Clinic Effluent,” *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 3 (2011) 831–837.
- [2] Insuwiasri, “Paradigma Kejadian Penyakit Paparan Merkuri,” *Jurnal Ekologi Kesehatan*, Vol. 7 (2008) 775–785.
- [3] E. Hodgson, “*Textbook of Modern Toxicology*,” 3rd Ed. New Jersey : John Wiley and Sons, Inc (2004) ch. 5.
- [4] N. Hachiya, “The History And The Present Of Minamata Disease,” *Japan Medical Association Journal*, Vol 49 (2006) 112–118.
- [5] N.L. Brown, Y.C. Shih, C. Leang, K.J. Glendinning, J.L. Hobman, and J.R. Wilson, “Mercury Transport and Resistance,” *Biochemical Society Transactions*, Vol 30 (2002) 715–718.
- [6] A.M.A. Nascimento, and E. Chartone-Souza, “Operon mer : Bacterial Resistance To Mercury And Potential For Bioremediation Of Contaminated Environments,” *Genetics and Molecular Research*, Vol. 2 (2003) 92–101.
- [7] H.R. Dash and S. Das, “Bioremediation of Mercury and The Importance of Bacterial mer Genes,” *International Biodeterioration and Biodegradation*, Vol. 75 (2012) 207–213.
- [8] E. Zulaika, A. Luqman, T. Arindah, dan U. Sholikah, “Bakteri Resist Logam Berat yang Berpotensi Sebagai Biosorben dan Bioakumulator,” *Seminar Nasional Waste Management for Sustainable Urban Development*, Feb. 21 (2012) Teknik Lingkungan, FTSP-ITS Surabaya Indonesia.
- [9] I.G. Rojas, A.B.T. Geraldo, and N.M. Sarmiento, “Optimising Carbon and Nitrogen Sources for *Azotobacter chroococcum* Growth,” *African Journal of Biotechnology*, Vol. 10 (2011) 2951–2958.
- [10] Z. Mazinani, M. Aminafshar, A. Asgharzadeh, and M. Chamani, “Effect of *Azotobacter* Population On Physico-Chemical Characteristics of Some Soil Sample In Iran,” *Annals of Biological Research*, Vol. 3 (2012) 3120–3125.
- [11] E. Zulaika, “Eksplorasi Bakteri Resist Merkuri (BRM) Endogenik Kalimas Surabaya Sebagai Kandidatus Agensi Pencemaran Merkuri,” *Disertasi*, Univ. Airlangga, Surabaya (2013).
- [12] S. Ray, R. Gatchhui, K. Pahan, J. Chaudhury, and A. Mandal, “Detoxification of Mercury and Organomercurials by Nitrogen-Fixing Soil Bacteria,” *Journal Bioscience*, Vol. 14 (1989) 173–182.
- [13] www.digilib.its.ac.id
- [14] Z.H. Hasibuan, T. Sabrina, dan M.B. Sembiring, “Potensi Bakteri *Azotobacter* dan Hijauan *Mucuna bracteata* Dalam Meningkatkan Hara Nitrogen Kompos Tandan Kosong Kelapa Sawit,” *Jurnal Agroekoteknologi*, Vol. 1 (2012) 237–253.
- [15] R. Saraswati, E. Husen, dan R.D.M. Simanungkalit, “*Metode Analisis Biologi Tanah*,” Jawa Barat : Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Sumber Daya Lahan Pertanian (2007) ch 2.
- [16] J.P. Harley, and L.M. Prescott, “*Laboratory Exercises in Microbiology*,” 5th Ed. USA : The McGraw-Hill Companies (2002).
- [17] M. Stella, and M. Suhaimi, “Selection of Suitable Growth Medium For Free-Living Diazotrophs Isolated From Compost,” *Journal Tropical Agricultural and Food Science*, Vol. 38 (2010) 211–219.
- [18] M.T. Madigan, J.M. Martinko, D.A. Stahl, and D.P. Clark, “*Brock Biology of Microorganisms*,” 13th Ed. USA : Pearson Education, Inc. (2012).
- [19] A.E. manampiring, dan B.J. Keppel, “Studi Populai Bakteri Resist Merkuri Di Daerah Aliran Sungai Tondano, Kelurahan Ketang Baru, Manado,” *Jurnal Ilmiah Sains*, Vol. 11 (2011) 26–30.
- [20] M. Narita, K. Chiba, H. Nishizawa, H. Ishii, C.C. Huang, Z. Kawabata, S. Silver, and G. Endo, “Diversity of Mercury Resistance Determinants Among *Bacillus* Strains Isolated From Sediment of Minamata Bay,” *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 223 (2003) 73–82.
- [21] L. Ranjard, A. Richaume, L. Jocteur-Monrozier, and S. Nazaret, “Response of Soil Bacteria to Hg(II) in Relation to Soil Characteristics and Cell Location,” *FEMS Microbiology*, Vol. 24 (1997) 321–331.